

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17837

研究課題名（和文）慢性高血糖マウスのインスリン抵抗性と好中球機能からみた新しい術前血糖管理法の開発

研究課題名（英文）Development of a new preoperative glycemetic control method based on insulin resistance and neutrophil function in chronic hyperglycemic mice.

研究代表者

上野 喬平 (Ueno, Kyohei)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30833131

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：インスリン療法が糖尿病患者での好中球機能を改善させるメカニズムにPI3K-Akt経路が関与するかを調べた。マウス好中球では群間でリン酸化Aktの発現に変化を認めず、また、結果に一貫性を認めなかった。好中球様細胞に分化するHL60細胞を用いて貪食実験を行い、Aktの発現を調べた。貪食実験ではPI3K阻害薬で処理すると、分化HL60細胞の貪食率は低下した。高グルコース培地で培養した分化HL60細胞はLPSやLPS+インスリン刺激を行うことで、Aktの発現が増加した。以上から、In vitroで分化HL60細胞のAktの発現が増加すると、分化HL60細胞の貪食能が増加する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリンは血糖降下作用のほかに、好中球に作用し異物を貪食する能力を増加させたり、過剰な炎症である好中球細胞外トラップの産生を低下させたりする作用を持っている可能性がある。これらのメカニズムには、好中球細胞内のAktの発現が関与する可能性がある。貪食能に関与するAktの発現は、マクロファージや単球での報告はあるが、好中球での報告はほとんどない。糖尿病患者の術前の適切な血糖管理方法を模索するために、感染防御の最前線で機能する好中球の機能の解明は欠かせない。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether the PI3K-Akt pathway is involved in the mechanism by which insulin therapy improves neutrophil function in diabetic patients. Chronic hyperglycemic mice with blood glucose levels of 500 mg/dL or higher were created and treated with insulin therapy. The insulin intervention group showed no change in phosphorylated Akt expression compared to the chronically hyperglycemic mice, and the results were not consistent. Since mouse neutrophils have low protein levels, it was considered difficult to examine signaling, so we examined phagocytosis, phosphorylated Akt, and Akt expression using HL60 cells, which differentiate into neutrophil-like cells. The results suggested that increased expression of Akt in differentiated HL60 cells may increase phagocytosis ability of differentiated HL60 cells in vitro.

研究分野：麻酔・集中治療

キーワード：糖尿病 好中球機能 インスリン抵抗性 PI3K-Akt NETs

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1)術前の血糖管理期間

糖尿病を基礎疾患に持つ手術患者は多い。その中でも、血糖コントロール不良の患者は、好中球機能の低下に伴い術後の感染症発症のリスクが高い。そのため、糖尿病患者の周術期ガイドラインには術前血糖値の目標値に関する推奨が示されている。しかし、術前の目標血糖値達成までの期間やその維持期間などに関する報告はない。

#### (2)術前血糖降下療法と好中球機能

術前の血糖降下療法の至適な期間を検討するために、慢性糖尿病マウスを作成し、術前のインスリン療法を行い、好中球機能を調査した(先行研究)。その結果、術前のインスリン療法により、好中球の貪食能の改善と活性酸素産生能の改善を認めた。また、術前のインスリン療法により、マウスのインスリン抵抗性の改善も同時に認めた。インスリン抵抗性の発生には PI3K-Akt 経路およびプロテインキナーゼ C(PKC)経路の関与が示唆されている。この PI3K-Akt 経路および PKC 経路は貪食細胞にも共通して存在することが知られている。

#### (3)本研究の立案

PI3K-Akt 経路および PKC 経路はインスリン抵抗性の発生に関与し、貪食能力を持つ好中球機能にも関与する可能性がある。このことから、インスリン抵抗性の改善のタイミングが好中球機能も改善するタイミングであり、それが至適な血糖管理期間である可能性がある。そこで本研究では、インスリン療法による PI3K-Akt 経路および PKC 経路のシグナル伝達の改善が好中球機能の改善のメカニズムであるという仮説を立て、検証した。

### 2. 研究の目的

血糖コントロール不良患者に対する至適な術前血糖管理期間を模索する上で、インスリン療法による PI3K-Akt 経路および PKC 経路のシグナル伝達の改善が好中球機能の改善のメカニズムに関与するかどうかを調査する。

### 3. 研究の方法

(1)慢性高血糖マウスの作成と群分け：5週齢の雄性 C57BL/6J マウスに5日間連続でストレプトゾトシン(STZ:streptozotocin)50mg/kgを腹腔内投与して糖尿病を誘発し、慢性高血糖マウスを作成した。慢性高血糖マウスを作成後、インスリン投与群(DM+insulin)とインスリン非投与群(DM)の2群に分けた。また同週数の野生型のマウスをコントロール群(control)とした。インスリン投与群では、中間型インスリン(ヒューマリン N)を事前に検討したインスリンスライディングスケールに沿って1日2回投与し血糖管理を行った。

#### (2)好中球機能の測定

好中球細胞外トラップ(neutrophil extracellular traps:NETs)産生試験：マウス血液を溶血し白血球を抽出した後、Histopaque<sup>®</sup>を用いて好中球を分離した。分離した好中球にPMAを用いて刺激し、産生されたエラスターゼを吸光度プレートリーダーで測定した。

#### (3)インスリンシグナル伝達経路の分子活性の測定

ウエスタンブロットによるリン酸化 Akt 発現解析

マウス血液から好中球を分離後、好中球サンプルを電気泳動し、PVDF膜に転写する。その後、リン酸化 Akt 抗体または total Akt 抗体に続けて2次抗体を加える。反応液を散布し、CCDカメラで発光を検出した。

フローサイトメトリーによるリン酸化 Akt 発現解析

マウス血液から好中球を分離後、固定、膜透過処理を行う。PE 標識リン酸化 Akt 抗体を加え、フローサイトメトリーで測定した。

#### (4)分化 HL60 細胞を用いた in vitro 実験

分化 HL60 細胞の作成：1 $\mu$ M all-trans-Retinoic Acid(ATRA)を含む RPMI 培地で HL60 細胞を5-7日間37度5%CO<sub>2</sub>環境下で培養し、分化 HL60 細胞を作成した。

HL60 細胞が分化したかの確認実験：メイギムザ染色で形態の確認を顕微鏡下に行う。またフローサイトメトリーで表面抗原 CD11b の程度を確認した。

分化 HL60 細胞の貪食実験：分化 HL60 細胞を蛍光マイクロビーズと共に、5%CO<sub>2</sub>、37 でインキュベーションを行った。表面抗原を蛍光染色し、フローサイトメトリーで解析した。

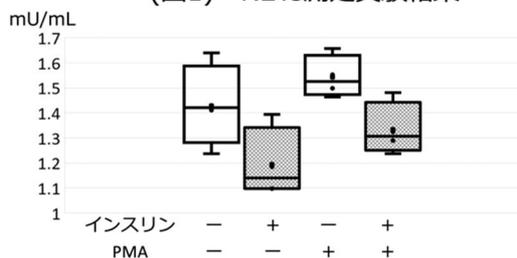
分化 HL60 細胞のリン酸化 Akt 発現解析：D-グルコース濃度を5.5mM、11mM、22mMそして、それぞれにLPSまたはLPS+インスリン投与した場合の合計9群において、上述のウエスタンブロットによるリン酸化 Akt 発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) マウス好中球の好中球細胞外トラップ産生試験

研究当初は、活性酸素産生能と PKC (protein kinase C) との関係性を調べる予定であったが、貪食能と NETs はともに AKT 経路と関連している可能性があり、ターゲットの分子経路を AKT 経路に絞った。そのため NETs をターゲットに研究を行った。その結果、NETs の産生能は DM 群と比較して DM+insulin 群では有意差は認められなかった (各群 n=4, p=0.057) が、DM+insulin 群で NETs 産生能が低下する傾向があった。また、好中球刺激剤である PMA (Phorbol myristate acetate) で刺激した場合も、NETs の産生能は DM 群と比較して DM+insulin 群では有意差は認められなかった (各群 n=4, p=0.057) が、DM+insulin 群で NETs 産生能が低下する傾向があった (図 1)。検出力に問題がある可能性があるため、今後サンプル数を増やす予定である。

(図 1) NETs測定実験結果



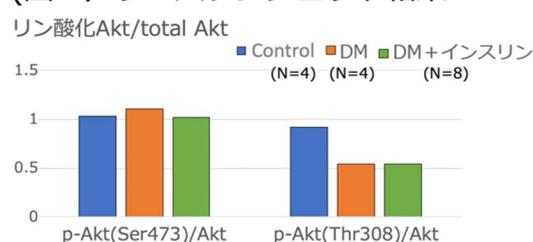
先行研究の結果と、上述の結果を踏まえて、インスリン療法はマウス好中球の PI3K-Akt 経路に関連がある可能性が高いと考えられた。次にマウス好中球の Akt の発現について検討した。

##### (2) リン酸化 Akt の測定

###### ウエスタンブロットの結果

control 群に比べて、DM 群ではリン酸化 Akt (Thr308) の発現が低下した。DM 群と DM+insulin 群ではリン酸化 Akt (Thr308) 発現の変化を認めなかった (図 2 右)。一方、リン酸化 Akt (Ser473) の発現については全ての群で変化を認めなかった (図 2 左)。同様の実験を複数回行ったが、結果に一貫性を認めなかった。

(図 2) ウエスタンブロット結果



###### フローサイトメトリーの結果

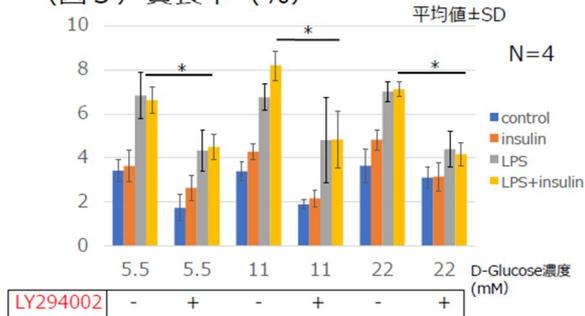
フローサイトメトリーによるマウス好中球でのインスリンシグナル伝達経路の分子活性評価を行ったが、有意な結果は出なかった。

過去の報告によると、好中球内の Akt のリン酸化が 60 分前後で脱リン酸化するとされている。本研究の実験で正確に捉えられていない可能性がある。また、好中球数も少なく、解析できるタンパク量も少ないため、(2)の結果のようになったと考えられた。以上からマウス好中球では、シグナル伝達を調べることが難しいと考えられた。そこで、我々は、HL60 細胞 (好中球に分化するヒト白血病細胞株) を用いて、貪食実験、リン酸化 Akt または Akt の発現実験を行った。

##### (3) 分化 HL60 細胞の貪食実験

D-glucose 濃度単独では貪食率に与える影響はあまり認められなかった。LPS 刺激を加えると、5.5mM、11mM、22mM D-glucose で培養した分化 HL60 細胞の貪食率がそれぞれ増加した。PI3K 阻害薬 (LY294002) で処理すると、分化 HL60 細胞の貪食率は低下した (図 3)。

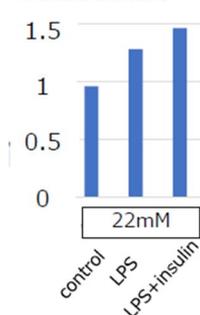
(図 3) 貪食率 (%)



##### (4) 分化 HL60 細胞のリン酸化 Akt、Akt の発現

22mM D-glucose 培地で培養した分化 HL60 細胞は LPS 刺激や LPS+インスリン刺激を行うことで有意差はないものの、Akt の発現が増加した (図 4)。リン酸化 Akt については発現が弱く、検出することができなかった。

(図 4) Aktの発現率



以上(3)(4)から、In vitro で分化 HL60 細胞の Akt の発現が増加すると、分化 HL60 細胞の貪食能が増加する可能性がある。貪食能に関与する Akt の発現は、マクロファージや単球での報告はあるが、好中球での報告はほとんどない。糖尿病患者の術前の適切な血糖管理方法を模索するために、感染防御の最前線で機能する好中球の機能の解明は欠かせない。引き続き、研究を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------